

夜香树 3 种甾体皂苷对人肝癌细胞株 BEL-7404 增殖抑制作用机制研究

赵世元¹, 农智新^{1*}, 叶海洪¹, 钟振国², 王璐瑶², 张明艳², 李彩萍²

(1. 广西壮族自治区民族医院, 南宁 530001; 2. 广西中医药大学, 南宁 530001)

[摘要] **目的:**探讨夜香树 3 种甾体皂苷(SSCN)对肝癌细胞株 BEL-7404 增殖抑制作用及其机制。**方法:**夜香树叶用有机溶剂提取并鉴定 3 种 SSCN, 体外培养 BEL-7404 细胞, 采用细胞集落形成法体外测定 SSCN 对人肝癌细胞株 BEL-7404 增殖的影响; 流式细胞技术检测细胞周期与凋亡率变化; 单细胞凝胶电泳(SCGE)分析细胞 DNA 损伤; 用质粒 PBR322 解旋反应观察 SSCN 对肿瘤 BEL-7404 细胞拓扑异构酶 II 的影响。**结果:**3 种 SSCN 对肝癌细胞 BEL7404 有明显的抑制作用, 并呈剂量-时间依赖性, 流式细胞仪分析结果显示, G_0/G_1 和 G_2/M 期细胞数增多, S 期减少, 呈现细胞阻滞现象, 并伴有大量的细胞凋亡。SSCN 可以引起 DNA 损伤, 对 Topo II 活性有抑制作用, 可抑制 Topo II 介导的质粒 DNA 超螺旋的解旋。**结论:**SSCN 对 BEL-7404 细胞具有增殖抑制和诱导凋亡作用, 其机制可能是: ①阻滞细胞于 G_2/M 期, 最终导致细胞死亡。②损伤 DNA, 造成 DNA 双链断裂。③抑制 Topo II 的催化活性, 使 DNA 超螺旋增加。

[关键词] 夜香树甾体皂苷; 肝癌细胞 BEL-7404; 细胞凋亡; 拓扑异构酶 II

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0212-05

[doi] 10.11653/zgsyfyjzxx2013070212

Effect of Three Kind of Steroid Saponins Extracted from *Cestrum nocturnum* on the Proliferation and its Anti-tumor Mechanism in Human Hepatocellular Carcinoma BEL-7404 Cell

ZHAO Shi-yuan¹, NONG Zhi-xin^{1*}, YE Hai-hong¹, ZHONG Zhen-guo²,
WANG Lu-yao², ZHANG Ming-yan², LI Cai-ping²

(1. Guangxi National Hospital, Nanning 530001, China;

2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of three kind of steroid saponins, extract obtained from *Cestrum nocturnum* on the human hepatocellular carcinoma BEL-7404 cell proliferation and its mechanism *in vitro*.

Method: Three kind of steroid saponins of the leaves of *C. nocturnum* (SSCN) were separated and identified their structures by solvent. The BEL-7404 cells were cultured *in vitro* and cell colony measurement technique assay was used to determine the inhibition of cell proliferation. Alteration of cell cycle and apoptosis rate was detected by flow cytometry (FCM). The single cell microgel electrophoresis technique was used to analyse effect of DNA damage of BEL-7404. The effects of SSCN on Topo II mediated-pBR322 DNA unwinding were measured by using agarose gel electrophoresis. **Result:** SSCN significantly inhibited the proliferation of BEL-7404 cells in a time and dose-dependent manner. The results from FCM assay indicated that the percentage of cells in S phase decreased, while the percentage of cells in G_0/G_1 and G_2/M phases increased, the phenomenon of blockage appeared and cell death

[收稿日期] 20120901(001)

[基金项目] 广西科技攻关项目(桂科攻 0816004-17); 广西医疗卫生科研课题(Z2008029)

[第一作者] 赵世元, 在读博士, 副主任技师, 从事教学与中药新药的研究开发, Tel: 08613978647518, E-mail: zhaoshiyuan_1105@163.com

[通讯作者] * 农智新, 医学硕士, 副主任医师, 从事肿瘤内科治疗, Tel: 086159977739301

was induced. The bioactive components of SSCN have effect on DNA damaged and inhibited the Topo II mediated relaxation of supercoiled pBR322 DNA effectively. **Conclusion:** SSCN could effectively inhibit cell proliferation and induce BEL-7404 apoptosis. With a direct relation to the dose and time, which may be correlated with factors as follows: ①SSCN can arrest the cell cycle at G_0/G_1 and G_2/M phase; ②DNA damage and cleavage of SSCN on DNA double strands may be a potential mechanism. ③SSCN can inhibit the catalytic activity of Topo II.

[**Key words**] steroid saponins of *Cestrum nocturnum*; human hepatocellular carcinoma BEL-7404; apoptosis; topoisomerase II

夜香树,茄科夜香树属植物(*Cestrum nocturnum* Linn.),原产热带美洲,现广植于热带地区,在我国主要分布在南方,其性温、味辛,具行气止痛、镇定之功效,民间用于治疗胃脘痛;课题组前期研究发现,夜香树叶和嫩枝的正丁醇和乙醇提取物体外对人体几种不同来源的肿瘤细胞都有较好的抑制作用,尤其对 BEL-7404 肝癌细胞有很好的抑制作用^[1-3]。本研究从夜香树叶正丁醇部位中分离得到 B4, B5, B6 等 3 种甾体皂苷(以下简称 SSCN),用 BEL-7404 跟踪筛选抗肿瘤活性,从分子生物学角度研究 SSCN 的抗肿瘤活性作用,并以 Topo 酶为靶点,初步探讨了 SSCN 的抗肿瘤作用机制。

1 材料

1.1 药物 夜香树甾体皂苷(SSCN),本实验室分离纯化,HPLC 纯度在 96% 以上,经鉴定为甾体皂苷类化合物 B4, B5, B6。

1.2 肿瘤细胞株 人肝癌细胞株 BEL-7404(购自上海细胞生物研究所细胞库)。

1.3 试剂 Rnase A(上海中能博采生物科技有限公司),牛血清白蛋白(上海沪峰生物科技有限公司),胎牛血清(Gibco),RPMI1640(Gibco),胰蛋白酶(武汉亚法生物技术拓展公司),二甲基亚砜(东方科技公司),碘化丙锭(propidium iodide, PI, Sigma),质粒 pBR322 DNA(大连宝生物工程有限公司),琼脂糖(大连宝生物工程有限公司);溴化乙锭(EB,东方科技公司)。

1.4 仪器 倒置荧光显微镜(Nikon,日本),倒置显微镜(Olympus,日本);流式细胞仪(美国,Beckman),CO₂ 培养箱(Binder,德国),CO₂ 培养箱(Thermo Forma,美国产),电泳仪(美国产),流式细胞仪(FACScantoTM,美国 BD 公司),琼脂糖凝胶电泳仪(南京实验仪器厂),GDS8000 凝胶成像系统(美国 UVP)。

2 方法

2.1 细胞培养 BEL-7404 常规培养于 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养基中,置于 37 °C 5% CO₂ 饱

和湿度培养箱中培养,2 ~ 3 d 换液,3 ~ 5 d 传代培养。

2.2 集落形成实验^[3] 取对数生长期的人肝癌细胞株 BEL-7404,经胰蛋白酶消化成单个分散细胞悬液,作活细胞计数,用含 10% NCS 的 RPMI 1640 培养液配成 200 个/mL 细胞悬液,取 35 mm 培养皿,3 个为 1 组,每个 2 mL,实验组加入含有终质量浓度为 10 mg·L⁻¹ 的不同受试药物的细胞悬液 2 mL,空白对照组则加入同体积培养液的细胞悬液 2 mL。摇匀后在 37 °C 饱和湿度、10% CO₂ 培养箱中培养 7 d,弃去培养液,先用瑞氏染色液染色 5 min,然后用 Giemsa's 溶液与 Sorensen 磷钼酸缓冲液以 1:9 混合成工作液(现配现用)。染色 10 min,流水冲洗、晾干,在 10× 的显微镜下计数值(含 50 个细胞以上)的集落,重复 3 次。对照组以培养液代替受试药物,结果以克隆形成率表示:

$$\text{集落形成率} = \frac{\text{克隆数}}{\text{接种细胞数}} \times 100\%$$

$$\text{集落抑制率} = (1 - \frac{\text{克隆数}}{\text{对照组克隆数}}) \times 100\%$$

2.3 细胞周期的 FCM 检测(PI 染色法) 取对数生长期 BEL-7404 细胞,调整密度为 1 × 10⁵ 个/mL 的细胞悬液,接种于 6 孔培养板中,每孔 2 mL,24 h 后分别加入终质量浓度为 10 mg·L⁻¹ 药物培养液,对照组加入等体积溶剂的培养液,每组设 3 个复孔,置培养箱中培养 72 h,离心收集细胞,PBS 洗 1 次,离心弃 PBS,再用 PBS 充分混匀细胞,加入冰冷的 70% 乙醇,混匀,用封口膜封口,4 °C 过夜。弃去 70% 乙醇,PBS 洗两次,用剩余的约 0.5 mL PBS 混匀固定的细胞,加入 RnaseA(终质量浓度为 50 mg·L⁻¹),37 °C 消化 1 h 后加入 PI(终质量浓度为 10 mg·L⁻¹),4 °C 染色 1 h。上机。在 FACScanto 流式细胞计上测定;氩离子激光器 488 nm 或 514 nm 波长光激发;阻断滤片为 620 nm 波长通滤片。分别通过对数荧光直方图和对数荧光散点图分析细胞凋亡、活细胞和坏死细胞的百分率。

2.4 单细胞凝胶电泳检测药物对肿瘤 BEL-7404 细胞 DNA 的损伤 取对数生长期 BEL-7404 细胞,用

含 10% 小牛血清 RPMI 1640 培养液配成密度为 1×10^6 个/mL 的细胞悬液,接种于 6 孔培养板中,每孔 2 mL,24 h 后吸去废液,分别加入含终质量浓度分别为 40,20,10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的药物培养液 2 mL,对照组加入等体积溶剂的培养液,每组设 3 个复孔,置培养箱中培养 72 h。冰浴终止反应,收集细胞,用冷 PBS 洗涤两遍,细胞沉淀用 0.5 mL 冰冷的 PBS 悬起。在完全磨砂的载玻片上用 1% 正常熔点琼脂糖 100 μL 铺片,盖上盖玻片,冰块上放置 2 min;移去盖玻片,将 1×10^6 个/mL 细胞悬液与低密度琼脂糖按 1:5 的比例混合,取 100 μL 作为第 2 层,加盖玻片,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱 10 min;移去盖玻片,将载玻片浸在 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的细胞溶解液中 [$2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris 缓冲液, 1% sodium sarcosinate],临用前加 pH 10 终体积分数为 1% Triton-100 和 10% DMSO),40 min 后将载玻片从裂解液中取出,用 PBS 小心冲洗 2 遍。水平放入电泳槽中,电泳槽中倒入预冷的电泳液 ($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA}$, $300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH),放置 30 min,使 DNA 解旋,室温下电泳 30 min(电压 25 V,电流 240 mA),电泳后经溴化乙锭(EB)染色。每组制 3 张片,每张片在荧光显微镜下观察并随机拍照。

2.5 对 BEL-7404 细胞 DNA 拓扑异构酶 II 的影响

2.5.1 BEL-7404 细胞 DNA 拓扑异构酶的提取

取对数生长期 BEL-7404 细胞,用含 10% 小牛血清 RPMI 1640 培养,在实验组中加入不同质量浓度的药物 (10,20,40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$),置培养箱中培养 72 h。收集细胞,2 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后用 PBS 洗涤,离心弃上清 10 mL TMN (Tris-HCl 1.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.5, MgCl_2 1.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 计数,调整细胞为 1×10^7 /mL。取 10 mL 细胞悬液加入 1 mL 10% 月桂酰肌氨酸钠 (Sarcosyl),冰浴放置 15 min,离心弃上清;加入 2 mL Buffer A [$50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-Cl pH 7.5, $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 (sucrose), $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2],轻摇 1 min;加入 0.6 mL Buffer B (同 A,但蔗糖为 0.6 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),5 500 $\times g$ 离心 10 min 弃上清;加入 2 mL Buffer C (同 A,但 MgCl_2 为 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,无 CaCl_2),5 500 $\times g$ 离心 10 min 弃上清;加入 0.15 mL Buffer D (同 A,但无蔗糖)后,8 μL $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙二胺四乙酸 (EDTA) 和 0.33 mL Buffer E [$80 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH 7.5, $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二硫苏糖 (DTT), $0.53 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 20% 甘油]混匀。置 4 $^{\circ}\text{C}$ 30 min,20 000 $\times g$ 离心 20

min 取上清(含 DNA 拓扑异构酶);加等体积甘油、牛血清白蛋白(BSA 终浓度 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)和苯甲基磺酰氟(PMSF 终浓度 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$),分装后置 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.5.2 SSCN 在 BEL-7404 细胞内对 DNA 拓扑异构酶的影响

1 μg PBRS322 DNA 加入 5 μL 断裂缓冲液 ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH 7.5, $85 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT, $30 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BSA, $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP)及不同浓度的酶提取液,空白管不加酶液,并加蒸馏水至 20 μL ,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min。加 1 μL 混合液 (10% SDS 10 μL + 1 μL 蛋白酶 K $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 终止反应,继续温育 30 min,加 2 μL 上样 10 \times 凝胶缓冲液 (6 \times 缓冲液:0.25% 溴酚蓝,0.25% 二甲基苯青 FF, 30% 甘油水溶液)。点样于 0.8% 的软琼脂凝胶上,在 40 ~ 50 V 电压,电泳 1.5 h,溴化乙锭(EB)染色 30 min,在 260 nm 紫外灯观察。

2.5.3 SSCN 体外对质粒 DNA 的直接影响

另设 1 组只加 pBR322 DNA 和 SSCN,不加 Topo II,反应条件同 2.5.2,检测 SSCN 对 DNA 的直接作用。

2.6 数据分析

实验数据采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,单因素方差分析组间差异,两样本均数比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 集落形成实验

相同质量浓度 ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 B4, B5, B6 作用 BEL-7404 细胞 7 d 后,所形成的细胞集落数不等, B4, B5, B6 的集落形成率分别为 66.35%, 60.31%, 77.55%, 与空白对照组比较,有显著性差异 ($P < 0.01$),见表 1,图 1。

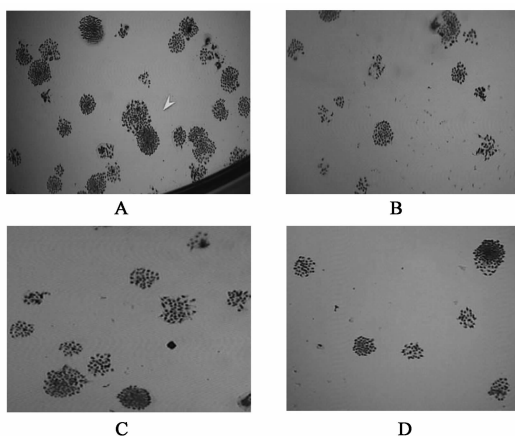
表 1 3 种 SSCN 对 BEL-7404 细胞集落形成的影响 ($\bar{x} \pm s$)

受试样品	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	集落数 /个	集落形成率 /%	集落抑制率 /%
空白对照	-	104.00 \pm 2.78	52.00	-
5-FU	10	19.18 \pm 3.00 ¹⁾	9.59	81.56
B4	10	35.00 \pm 3.68 ¹⁾	17.50	66.35
B5	10	32.56 \pm 2.83 ¹⁾	19.72	60.31
B6	10	23.35 \pm 3.98 ¹⁾	11.68	77.55

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 细胞周期的 FCM 检测 (PI 染色法)

SSCN 作用 BEL-7404 细胞 72 h 后,在 DNA 直方图上均呈特征性的亚二倍体峰,其中 B4, B5, B6 组的凋亡率分别为 22.8%, 12.6%, 23.1%, 与对照组比较均有明显的差异 ($P < 0.01$)。不同周期细胞的比例也发生变化,表现为 B4, B5, B6 处理组给药 72 h 后, G_0/G_1



A. B5 组;B. B4 组;C. B6 组;D. 5-FU 10 mg·L⁻¹组

图 1 B4, B5, B6 各 10 mg·L⁻¹对 BEL-7404 细胞集落形成的影响(Giemsa 染色, ×40)

和 G₂/M 期细胞数增多, S 期减少, 说明 SSCN 作用 BEL-7404 后有 G₂/M 期细胞阻滞现象, 从而抑制细胞增殖。见表 2。

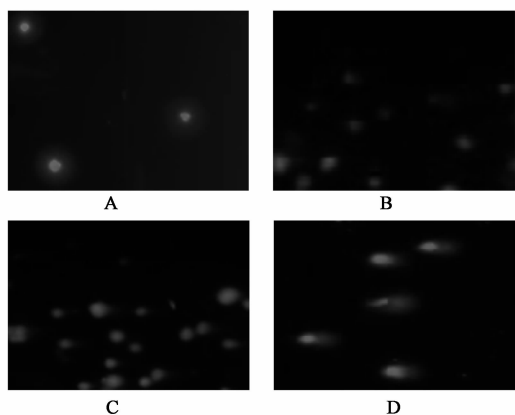
表 2 3 种 SSCN 对 BEL-7404 细胞周期分布和凋亡指数的影响

药物	质量浓度 /mg·L ⁻¹	%			
		G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期	凋亡 指数
对照	-	41.6	35.2	23.2	4.0
B4	10	59.6	9.8	30.6	22.8 ²⁾
B5	10	62.5	3.4	34.0	12.6 ²⁾
B6	10	69.1	2.6	28.3	23.1 ²⁾

注:与对照组比较²⁾P < 0.01。

3.3 单细胞凝胶电泳检测药物对肿瘤 BEL-7404 细胞 DNA 的损伤 图 2 显示了采用不同浓度的 B4, B5, B6 作用 BEL-7404 细胞 72 h 后, B4, B5, B6 能够剂量依赖性地引起 BEL-7404 细胞 DNA 双链断裂。如图所示, 对照组中的细胞为圆形, 无拖尾现象的出现, 说明其 DNA 未受到损伤(图 2 A); BEL-7404 经过样品处理后, 可见细胞出现拖尾现象(图 2 B C D), 随着样品剂量的加大, “彗星”细胞出现的频率升高, “彗星”尾长度增加形状变大, 说明 DNA 损伤越来越严重。

3.4 药物对肿瘤 BEL-7404 细胞 DNA 拓扑异构酶 II 的影响 如图 3 所示:泳道 1 是负超螺旋 pBR322 DNA(SC); 在泳道 2 中, 在仅有 Topo II 作用时, 超螺旋 DNA 大部分转化为解旋的 DNA。当反应体系中加入 Topo II 抑制剂 VP16 后, 解旋的 DNA 明显减少, DNA 保持超螺旋状态, 表明 Topo II 的活性受到了抑制(泳道 4, 7, 10)。同样, B4, B5, B6 也可以抑制 Topo II 的活性, 随着作用浓度的增高, 解旋的



A. 对照组;B. B6 组;C. B5 组;D. B4 组

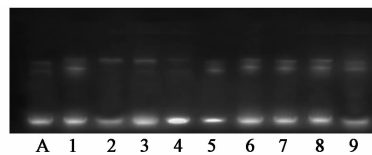
图 2 B4, B5, B6 10 mg·L⁻¹作用 BEL-7404 细胞 72 h 的彗星形态

DNA 明显减少, 当 B4, B5, B6 的作用浓度达到 40 mg·L⁻¹时, 完全抑制了 Topo II 的活性。



1. 0.2 μg pBR322 DNA; 2. 0.2 μg pBR322 DNA + 1 U Topo II; 3. 1 U Topo II + 0.2 μg pBR322 DNA + 100 μM VP16; 4 ~ 6. 1 U Topo II + 0.2 μg pBR322 DNA + B4 (40, 20, 10 mg·L⁻¹); 7 ~ 9. 1 U Topo II + 0.2 μg pBR322 DNA + B5 (40, 20, 10 mg·L⁻¹); 10 ~ 12. 1 U Topo II + 0.2 μg pBR322 DNA + B6 (40, 20, 10 mg·L⁻¹)

图 3 B4, B5, B6 对 Topo II 的影响



A. 质粒 DNA: 0.2 μg pBR322 DNA;

1 ~ 3. 0.2 μg pBR322 DNA + B4 (10, 20, 40 mg·L⁻¹); 4 ~ 6. 0.2 μg pBR322 DNA + B5 (10, 20, 40 mg·L⁻¹); 7 ~ 9. 0.2 μg pBR322 DNA + B6 (10, 20, 40 mg·L⁻¹)

图 4 B4, B5, B6 对 pBR322 DNA 的直接影响

不同浓度的 B4, B5, B6 和同一浓度质粒 DNA 混合, 从图 4 可以看出, 低浓度和较高浓度的 B4, B5, B6 (10, 20, 40 mg·L⁻¹) 对 DNA 均无直接切割作用, 使 DNA 仍以超螺旋状态存在。

4 讨论

集落形成实验反映的是单个细胞的增殖潜力, 是单个细胞分裂 6 代或 6 代以上时, 其后代所组成

的群体(集落),能灵敏的测定抗肿瘤药的活性^[4-5],是评价抑制肿瘤细胞增殖作用的简便而可靠的指标。

细胞的 DNA 损伤可以产生比如周期阻滞等事件^[6]。抗癌药物的一个治疗靶点是扰乱肿瘤细胞周期,已有许多抗肿瘤试剂及 DNA 损伤试剂可以在 G₀/G₁, S 或 G₂/M 期阻滞细胞周期然后诱导细胞死亡^[7-8]。

单细胞凝胶电泳(SCGE)检测细胞内 DNA 损伤情况。该方法的基本原理是发生损伤的 DNA 经解旋后, DNA 从核中溢出,在电场中向着正极方向泳动,经 EB 染色后,受损的细胞会形成类似“彗星”拖尾的现象。未损伤的仍留在核中保持球形,构成彗星头部,通过对彗星细胞的观察和统计,可以很好地反映出细胞损伤和损伤程度。在中性电泳条件下,该方法能够比较特异地检测 DNA 双链断裂损伤。

DNA 拓扑异构酶是一种重要的核酶,包括 I 型(Topo I)和 II 型(Topo II),通过 DNA 链断裂和重接而改变 DNA 的拓扑结构,调节其空间构型变化,在细胞生长过程中起重要作用,该酶被列为筛选抗肿瘤药物的重要靶酶^[9]。拓扑异构酶(Topo)可以通过调节超螺旋、连锁、去连锁以及核酸解节作用,影响 DNA 拓扑结构。一般而言,肿瘤细胞中的 Topo 含量往往明显高于正常细胞,抑制其活性就可能抑制肿瘤细胞的快速增殖,进而杀死肿瘤细胞。pBR 322 DNA 是一种质粒 DNA,其主要有 3 种形式,即超螺旋 DNA(supercoiled DNA, SC), 缺口环状 DNA 和线性 DNA,在琼脂糖凝胶电泳上可显示 3 条带。在 ATP 存在的情况下, Topo II 可以使超螺旋的 DNA 转化为解旋状态(RLX)。

本实验以 BEL7404 细胞为研究对象,用不同浓度的 B4, B5, B6 处理 BEL7404 细胞,随着药物浓度的升高和作用时间的延长,细胞数目不断减少,呈现出显著的时间-浓度效应,细胞的生长受到完全抑制,并且有部分细胞死亡。B4, B5, B6 对 BEL7404 细胞的集落抑制率均在 60% 以上;用 5, 10, 20 mg · L⁻¹ B4, B5, B6 处理 BEL7404 细胞后,细胞周期出现了 G₂/M 期阻滞,通过流式分析,发现 Sub-G₁ 期的细胞百分比增加,有时间及浓度依赖性。这说明 CNSS 处理细胞诱导 DNA 损伤后,细胞对损伤的

DNA 进行了修复,没有被修复的细胞最后发生了凋亡,而通过单细胞凝胶电泳实验出现尾部荧光强度的增加,说明尾部 DNA 的损伤越严重。B4, B5, B6 可以明显抑制 Topo II 的催化活性,并呈现出较好的量-效关系; B4, B5, B6 对质粒 DNA 分子没有直接断裂作用,提示其对 DNA 的作用可能是通过靶点 Topo 来介导的,而不是它直接作用的结果。

综上所述: SSCN 对 BEL-7404 细胞具有增殖抑制和诱导凋亡作用,其机制可能是: ①阻滞细胞于 G₂/M 期,最终导致细胞死亡。②损伤 DNA,造成 DNA 双链断裂。③抑制 Topo II 的催化活性,使 DNA 超螺旋增加。

[参考文献]

- [1] 钟振国,赵世元,吕金燕,等. 夜香树提取物体内抗肿瘤作用实验研究[J]. 中药材, 2008, 31(11): 1709.
- [2] 赵世元,钟振国,廖文,等. 夜香树提取物体外抗肿瘤作用的实验研究[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20: 125.
- [3] 黄燕,李鹏,罗雪菲,等. 夜香树提取物对荷瘤小鼠免疫功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(15): 114.
- [4] 金延华,刘春彦,金爱花,等. 草苈蓉苯丙素苷对肺癌细胞周期分布和凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 17(7): 213.
- [5] 申漫里,冯永东,高纯,等. 细胞周期蛋白 B1 在肿瘤细胞中的非时相性表达[J]. 中华肿瘤杂志, 2002, 24(3): 215.
- [6] Klucar J, Al-Rubeai M. G₂ cell cycle arrest and apoptosis are induced in Burkitts lymphoma cells by the anticancer agent oracin[J]. FEBS Letters, 1997, 400: 127.
- [7] Paulovich A G, Toczyski D P, Hartwell L H. When check points fail[J]. Cell, 1997, 88: 315.
- [8] Agami R, Bernards R. Distinct initiation and maintenance mechanisms cooperate to induce G₁ cell cycle arrest in response to DNA damage[J]. Cell, 2000, 102: 55.
- [9] Kessel D, Luo Y. Cells in cryptophycin induced cell-cycle arrest are susceptible to apoptosis[J]. Cancer Letters, 2000, 151: 25.

[责任编辑 聂淑琴]